

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-203621

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

片内整理番号

FI

技術表示箇所

G 0 1 N 27/447

7235-2J

G 0 1 N 27/ 26

3 1 5 E

審査請求 未請求 請求項の数1(全 8 頁)

(21)出願番号 特願平4-13174

(22)出願日 平成4年(1992)1月28日

(71)出願人 390037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(72)発明者 野村 一男

茨城県竜ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社つくば工場探索合成グループ内

(72)発明者 江幡 順良

茨城県竜ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社つくば工場探索合成グループ内

(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリアクリルアミド系電気泳動用ゲルプレートの製造方法

(57)【要約】

【構成】 高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液を任意の比率で混合し、当該混合液をゲル支持体を導入することを特徴とする任意のゲル濃度を有するポリアクリルアミド系電気泳動用ゲルプレートの製造方法。

【効果】 蛋白質に代表される生体高分子等の分析に有用な高品質のポリアクリルアミド系ゲル電気泳動用ゲルプレートが、再現性よく大量に得られ、また複数段の濃度を有するゲルや濃度勾配を有するゲルの製造、多品種製造における作業性が著しく改善される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液を任意の比率で混合し、当該混合液をゲル支持体に導入することを特徴とする任意のゲル濃度を有するポリアクリルアミド系電気泳動用ゲルプレートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はポリアクリルアミド系電気泳動用ゲルプレートの製造方法、さらに詳しくは特にタンパク質等の生体高分子成分の電気泳動分析に適したポリアクリルアミド系電気泳動用ゲルプレートを大量に製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ポリアクリルアミドゲルは、タンパク質、核酸等の生体高分子成分の電気泳動分析に多用されており、通常アクリルアミドのような単量体とN、N'-メチレンビスアクリルアミドのような二官能性または多官能性の架橋剤を含む約2重量%～約40重量%水溶液（以下アクリルアミド系モノマー溶液ということがある）に重合開始剤を添加して単量体と架橋剤を架橋重合させることにより形成されている。重合開始手段としては、過酸化剤と還元剤の組み合わせ、あるいは過酸化剤-還元剤-光増感剤-励起光の組み合わせ（還元剤を含まない場合もある）が用いられる。このうち後者の光重合反応については、重合開始剤を加えても光を照射するまで重合反応が起こらない方法（特開昭62-91849号公報参照）等があるものの、ゲル形成用溶液の遮光等反応液の取り扱いやゲル化させる際の光の照射条件など重合反応の制御がむずかしいうえに、製造終了後も光の存在下で重合反応を起こし、安定性、再現性のあるゲルを得られない等問題が多い。このため一般的には、液の取り扱いが比較的簡単で、触媒量で重合をある程度制御できる、前者の過酸化剤と還元剤の組み合わせによる化学重合反応が採用されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この過酸化剤と還元剤の組み合わせによる化学重合反応によるゲル調製の場合、モノマー溶液にこのような重合開始剤を添加するとすぐに反応が開始し、粘性の上昇およびゲル化がおこるため、通常モノマー溶液と重合開始剤溶液とを別に調液し、ゲル作製直前に混合する方法がとられている。しかし、過酸化剤溶液と還元剤溶液を別々にモノマー溶液に添加する場合は操作が煩雑になり、一方予め過酸化剤と還元剤を共存させるとその触媒活性が経時的に変化するため一定の高品質のゲル作製が困難であるという問題があった。

【0004】また、ポリアクリルアミドゲルは、ゲル濃度によってその分子ふるい効果が変わるため、分離分析対象となる成分の分子量等によって、様々なゲル濃度を

もつものが要求される。従来ポリアクリルアミドゲルは、このように分離分析対象にあわせて特定のゲル濃度のモノマー溶液を予め調液し、これに重合開始剤を加えて支持体に注入または塗布することにより作製されるため、分離分析対象が多岐にわたる場合には、多種類の濃度のゲル形成用モノマー溶液を調液せねばならなかった。また、分子量等の分布範囲の広い試料を分離分析するのに有効な濃度勾配ゲルを調製する場合においても、従来は、濃淡2種のモノマー溶液を調製しておき、これに重合開始剤を加えて濃度勾配形成装置を介して支持体に注入または塗布する方法がとられているために、多量の単一濃度ゲル調製の場合と同様、数種類の異なった濃度勾配をもつゲルを作製するには、これにあわせて種々の濃度のモノマー溶液を予め調液し、組み合わせで用いねばならなかった。さらに、安定性のよいゲルを作製するには、重合開始剤が過剰または過少にならないようモノマー溶液の濃度にあわせて加える重合開始剤量を調節する必要があった。このように、ポリアクリルアミドゲルの製造は、作業が非常に煩雑で熟練を必要とするため、大量の高い品質のゲルを安定的に供給することが困難であった。

【0005】従って、本発明の目的は、ゲル支持体への注入前または塗布前に重合開始剤触媒活性の変化がなく、また、多種類の濃度のモノマー溶液や重合開始剤溶液を調液することなく、任意のゲル濃度または濃度勾配をもつ安定性のよい高品質高分解能ポリアクリルアミド水性ゲルを容易に再現性よく、大量にまた多種類製造できる方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】かかる実状において、本発明者らは上記課題を解決すべく種々検討してきた結果、高濃度のモノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液をそれぞれ一種類のみ調液しておき、これを任意の比率で混合して濃度調整すれば、重合開始剤触媒活性の変化がなくかつ適正な重合開始剤量で、極めて簡単に、一定高品質の任意のゲル濃度を有するゲルが高い再現性で大量に製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液を任意の比率で混合し、当該混合液をゲル支持体に導入することを特徴とする任意のゲル濃度を有するポリアクリルアミド系電気泳動用ゲルプレートの製造方法を提供するものである。

【0008】本発明において予め調液しておく溶液は、高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液の三種類のみであり、多種類のモノマー溶液を調液しておく必要はない。また、これらの溶液は、一時に多量に調液し、それを連続して、または必要に応じて少量ずつ取り出して使用する

ることができる。

【0009】本発明に用いられる高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液には、アクリルアミド系モノマーおよび架橋剤、さらに必要に応じて変性剤としての陰イオン界面活性剤、pH緩衝剤等を含有させることができる。

【0010】アクリルアミド系モノマーの例としては、アクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N、N'-ジメチルアクリルアミド、N-(ヒドロキシメチル)アクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド等のアクリルアミドホモログ；メタクリルアミド等が挙げられる。これらの化合物は単独で、または2種以上を組み合わせる。これらの化合物のうちではアクリルアミドが好ましく、またアクリルアミドと他のアクリルアミド系モノマーの1種以上との併用も可能である。

【0011】架橋剤としては、二官能性または三官能性以上の架橋剤化合物を用いることができる。二官能性化合物の具体例として、N、N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS)、N、N'-プロピレンビスアクリルアミド、ジアクリルアミドジメチルエーテル、ビヘラジンジアクリルアミドなどが挙げられる。これらの架橋剤のうちではBISが好ましい。架橋剤は2種以上を組み合わせることもできる。

【0012】陰イオン界面活性剤としては、アルキル硫酸塩、特に炭素原子数10以上の長鎖アルキル基を有するアルキル硫酸塩が好ましく、なかでもドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が最も好ましい。

【0013】pH緩衝剤としては、「化学便覧 基礎編」(日本化学会編)等に記載のpH緩衝剤系があり、具体例としては、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)、N、N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン、N-2-ヒドロキシビヘラジン-N'-2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸Na塩等およびこれらのいずれかと必要により組み合わせられる酸、アルカリまたは塩がある。一般的によく用いられる緩衝剤系の例としてTris-塩酸緩衝液(pH7.0~9.2用組成)が挙げられる。

【0014】本発明に用いられるアクリルアミド系モノマー溶液の濃度(アクリルアミド系モノマーと架橋剤の合計)は、通常要求されるゲル濃度よりも高い濃度、例えば10~98重量%、好ましくは20~50重量%であることが好ましい。また、架橋剤は、モノマーと架橋剤の合計重量に対して約1~30重量%、特に約2~10重量%の範囲で用いるのが好ましい。

【0015】アクリルアミド系モノマー溶液の調製は、前記成分を水または水と有機溶媒との混合溶媒に溶解または分散させることにより行なわれる。

【0016】本発明に用いられる過酸化剤としては、公知の電気泳動法解説書(寺田弘編「電気泳動法-基礎と実験」等)に記載の過酸化剤、例えばペルオキソ二硫酸

アンモニウム、ペルオキソ二硫酸アルカリ金属塩等が挙げられる。

【0017】過酸化剤溶液の濃度は、モノマー溶液の希釈剤としての機能および重合開始剤としての機能の両面から低濃度であることが必要であり、例えば0.001~5.0重量%、特に0.005~1.0重量%が好ましい。また、過酸化剤溶液の調製は、上記過酸化剤、および必要に応じて陰イオン界面活性剤、pH緩衝剤等を、水または水を有機溶媒との混合溶媒に溶解または分散させることにより行なわれる。

【0018】本発明に用いられる還元剤としては、公知の電気泳動法解説書(寺田弘編「電気泳動法-基礎と実験」等)に記載のアミン系化合物等があり、具体例としてN、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)、N、N'-ジメチルエチレンジアミン、3-ジメチルアミノ-n-プロピルアミン、3-ジメチルアミノプロピオニトリル、N-nブチルジメチルアミン、N、N'-ジメチルピペラジン等が挙げられる。

【0019】還元剤溶液の濃度は、モノマー溶液の希釈剤としての機能および重合開始剤としての機能の両面から低濃度であることが必要であり、例えば0.001~5.0重量%、特に0.005~1.0重量%が好ましい。また還元剤溶液の調製は、上記還元剤および必要に応じて陰イオン界面活性剤、pH緩衝剤等を、水または水と有機溶媒との混合溶媒に溶解または分散することにより行なわれる。

【0020】予め調製した高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液を混合して任意のゲル濃度となるような混合液を得るには、過酸化剤と還元剤の反応を防止するため、これらの3者を同時に混合し、攪拌するのが望ましい。ここで、任意のゲル濃度とは、アクリルアミド系モノマーと架橋剤の合計量が任意の濃度であることをいい、通常ゲル濃度は2~5w/v%となるように調整される。また、得られた混合液をゲル支持体に導入するには、混合液をゲル支持体中に送液または塗布すればよい。ゲル支持体としては、一般的に使用されているガラス管、ガラス板、有機ポリマー支持体等公知の支持体を使用可能である。

【0021】これらの3種類の溶液を混合し、ゲル支持体へ導入する工程の好適な例を図1に示す。すなわち、過酸化剤溶液(A液)、還元剤溶液(B液)、アクリルアミド系モノマー溶液(C液)の3種類の溶液は、それぞれポンプ(P)により送液され、ミキサー(M)により攪拌・混合されてゲル支持体に送り込まれる。3種類の溶液を送液するポンプの流量比を変えることにより、任意のゲル濃度の溶液を調液することが可能である。さらに、図1に示すように、ポンプの流量比をコントローラ(CB)を介してコンピューター(PC)で制御す

ることにより、図2に示す様に断続的にゲル濃度を変えたり、図3に示す様に濃度比の連続的変化により濃度勾配を形成させることが簡単にできる。

【0022】なお、本発明により得られる電気泳動用ゲルプレートは、泳動像の検出または読み取りの容易性から実質的に無色透明であることが好ましい。

【0023】本発明方法により得られたゲルプレートは、前述の諸文献や特許明細書等に記載の公知の方法に従って、水平型および垂直型電気泳動法等に用いることができる。

【0024】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、もとより本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0025】実施例1

表1に記載の組成の本発明のゲル作製用溶液試料A（A1～A3）、および比較対象として過酸化剤と還元剤の混合溶液（B1）とアクリルアミドと架橋剤の混合溶液（B2）からなる溶液試料B（B1およびB2）を調製*

*した。これらの2系統のゲル作製用溶液を、脱気・溶存酸素量調整後ヘリウム雰囲気下4℃で保存し、表2に記載の各時間経過時点で各溶液を取り出して、同一ゲル濃度になるように一定比率で混合し、4℃で混合後ゲル化が始まるまで（反応熱により混合溶液温度が上がり始めるまで）の時間（以下ゲル化開始時間という）を測定し、表2に記載の結果を得た。試料Aでは時間経過にかかわらずゲル化開始時間は一定だったのに対し、試料Bでは経過時間によってゲル化開始時間が変動し、24時間後には溶液を混合してもゲル化しない状態となった。また、同様に調液、保存した試料Aおよび試料Bを用いて、時間経過毎にスラブ型電気泳動用ゲルプレートを作製したところ、試料Aでは時間経過の影響が認められなかったのに対し、試料Bでは時間経過により全体にすじっぽいゲルができるようになり、泳動像の歪みが起こった。

【0026】

【表1】

ゲル作製用溶液の成分	試料A（本発明）			試料B（比較例）	
	過酸化剤溶液 (A1)	還元剤溶液 (A2)	モノー溶液液 (A3)	B1	B2
アクリルアミド	—	—	390g	—	390g
BIS	—	—	10g	—	10g
pH緩衝液	250ml	250ml	250ml	250ml	250ml
APS	0.07g	—	—	0.035g	—
TEMED	—	0.06ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml
水を加えて全量を	1000ml とする	1000ml とする	1000ml とする	1000ml とする	1000ml とする

(注) BIS : N, N'-メチレンビスアクリルアミド (架橋剤)

pH緩衝液 : 1.5M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-塩酸緩衝液 pH8.8

APS : ペルオキソ二硫酸アンモニウム (過酸化剤)

TEMED : N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (還元剤)

【0027】

【表2】

放置時間 (時間)		0	1	4	8	12	24
ゲル化 開始時間 (分)	試料A	35	34	35	33	34	35
	試料B	35	30	30	45	80	—*)

(注) 各経過時間において、試料AはA1:A2:A3=3:3:2で、
試料BはB1:B2=3:1で混合し、それぞれアクリルアミド10%
のゲル形成用溶液とする。

*) 試料Bは24時間後はゲル化せず。

【0028】このように、本発明の製造方法によれば、過酸化剤と還元剤の相互作用による触媒活性の変化を回避することができるため、常に一定の重合条件でゲルを作製することができ、高い再現性が得られる。また調製した溶液の長時間にわたる連続使用や保存が可能である。

【0029】実施例2

表1に記載の本発明のゲル作製用溶液試料A (A1~A3) を調製し、図1に示す装置を使用して、図4~図6で示す様な液量比変化によりスラブ型電気泳動用ゲルプレートを作製した。作製したゲルプレートは、公知の電気泳動法解説書に従って、既知分子量のタンパク質の混合試料 (分子重量マーカー) についてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、それぞれ図7~図9に示す様な泳動像を得た。このように、本発明の製造方法によれば、三種類の溶液を調製し、これらの混合パターンを変えるだけで、任意のゲル濃度や濃度勾配をもつゲルを作製することができるため、複雑な段取り替えを必要とせずに多品種の製造に容易に対応することができる。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば、蛋白質に代表される生体高分子等の分析に有用な高品質のポリアクリルアミド系ゲル電気泳動用ゲルプレートが、再現性よく大量に得られ、また複数段の濃度を有するゲルや濃度勾配を有するゲルの製造、多品種製造における作業性が著しく改善される。

【図面の簡単な説明】

10* 【図1】本発明の好ましい工程の概略を示す図である。

【図2】本発明における過酸化剤溶液 (A)、還元剤溶液 (B) および高濃度モノマー液 (C) の混合パターン例である、濃度を断続的に変化させる例を示す図である。

【図3】本発明における過酸化剤溶液 (A)、還元剤溶液 (B) および高濃度モノマー液 (C) の混合パターン例である、濃度を連続的に変化させる例を示す図である。

【図4】実施例2における過酸化剤溶液 (A1)、還元剤溶液 (A2) および高濃度モノマー溶液 (A3) の送液パターンを示す図である。

【図5】実施例2における過酸化剤溶液 (A1)、還元剤溶液 (A2) および高濃度モノマー溶液 (A3) の送液パターンを示す図である。

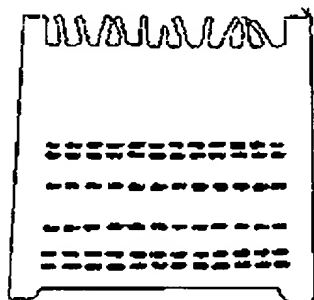
【図6】実施例2における過酸化剤溶液 (A1)、還元剤溶液 (A2) および高濃度モノマー溶液 (A3) の送液パターンを示す図である。

【図7】図4の送液パターンで送液することにより得られたゲルプレートを用いた場合の電気泳動像を示す図である。

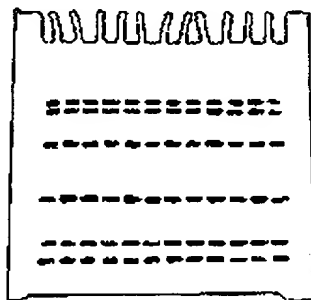
【図8】図5の送液パターンで送液することにより得られたゲルプレートを用いた場合の電気泳動像を示す図である。

【図9】図6の送液パターンで送液することにより得られたゲルプレートを用いた場合の電気泳動像を示す図である。

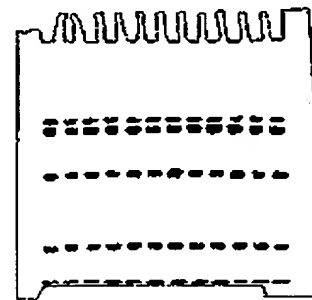
【図7】



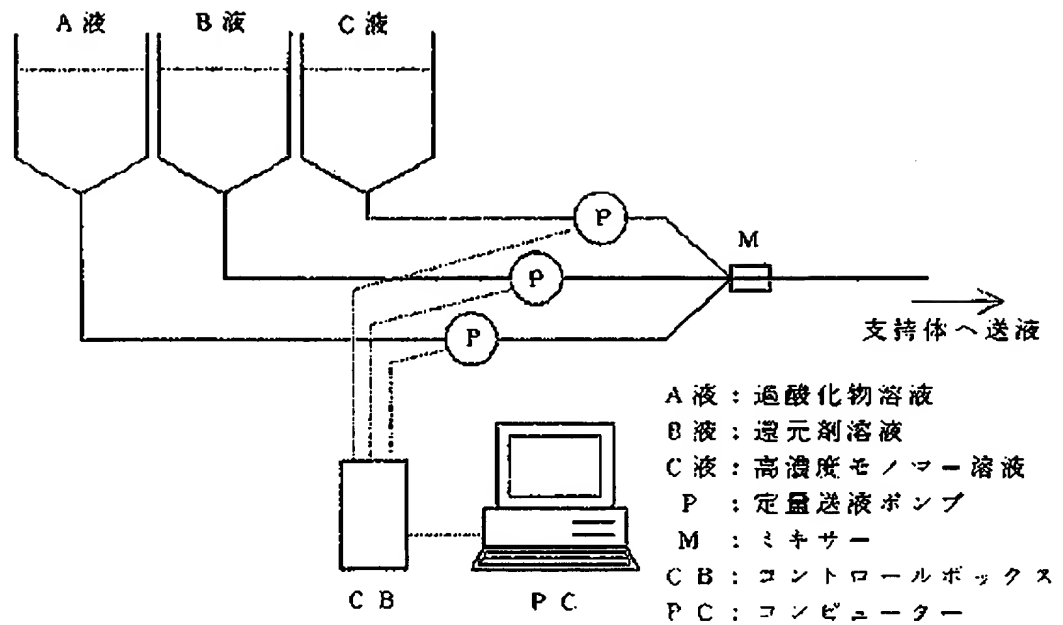
【図8】



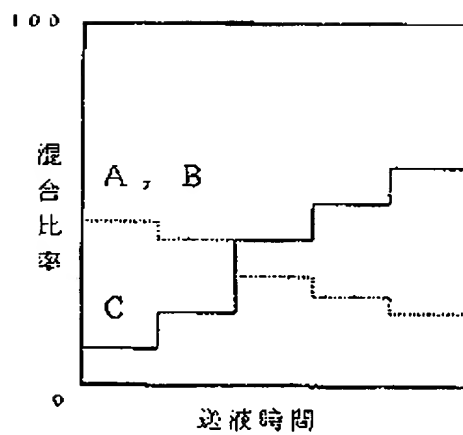
【図9】



【図1】

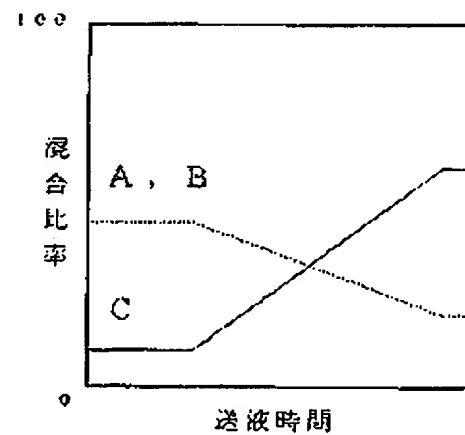


【図2】



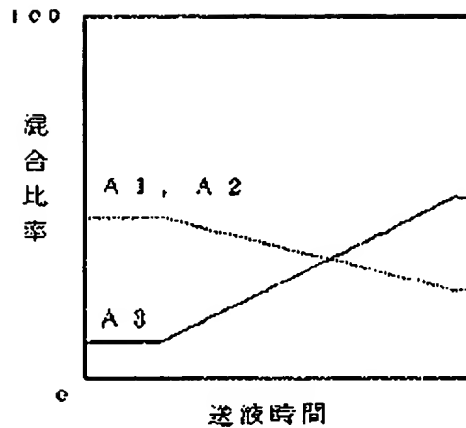
A : 過酸化物溶液
 B : 還元剤溶液
 C : 高濃度モノマー溶液

【図3】

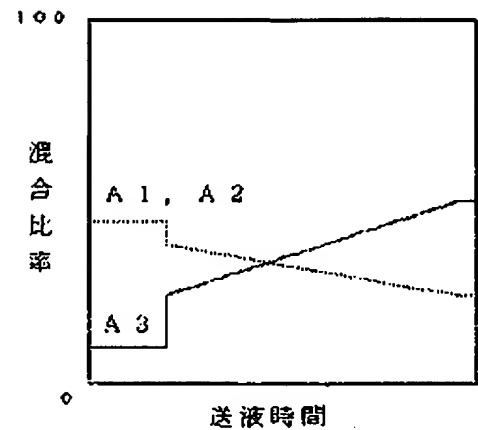


A : 過酸化物溶液
 B : 還元剤溶液
 C : 高濃度モノマー溶液

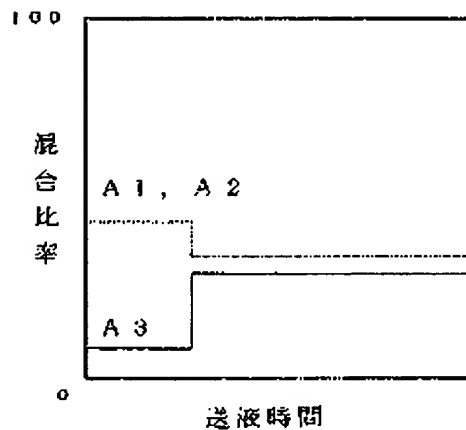
【図4】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成5年1月20日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】予め調製した高濃度のアクリルアミド系モノマー溶液、低濃度の過酸化剤溶液および低濃度の還元剤溶液を混合して任意のゲル濃度となるような混合液を得るには、過酸化剤と還元剤の反応を防止するため、こ

れらの3者を同時に混合し、攪拌するのが望ましい。ここで、任意のゲル濃度とは、アクリルアミド系モノマーと架橋剤の合計量が任意の濃度であることをいい、通常ゲル濃度は2～50w/v%となるように調整される。また、得られた混合液をゲル支持体を導入するには、混合液をゲル支持体中に送液または塗布すればよい。ゲル支持体としては、一般的に使用されているガラス管、ガラス板、有機ポリマー支持体等公知の支持体を使用可能である。

フロントページの続き

(72)発明者 宇田川 章子
茨城県竜ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社つくば工場探索合成グループ内

(72)発明者 白鳥 三恵子
茨城県竜ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社つくば工場探索合成グループ内